

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/085857 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/547
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001882
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 9 日 (09.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-061798 2004 年 3 月 5 日 (05.03.2004) JP  
特願2004-319087 2004 年 11 月 2 日 (02.11.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日清紡績株式会社 (NISSHINBO INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038650 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 番 1 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 秋山 めぐみ (AKIYAMA, Megumi) [JP/JP]; 〒2670056 千葉県千葉市緑区大野台 1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP]; 〒2670056 千葉県千葉市緑区大野台 1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMOBILIZED BIOMOLECULE AND METHOD OF DETECTING SUBSTANCE CAPABLE OF INTERACTING WITH BIOMOLECULE

(54) 発明の名称: 固定化生体分子及び生体分子と相互作用し得る物質の検出法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of conveniently efficiently and easily immobilizing a protein on a base material, a method of detecting a substance capable of interacting with the protein at a high sensitivity, and a protein and a base material for immobilizing the protein to be used in these methods. A method of detecting a substance capable of interacting with a protein by using an immobilized protein, wherein the immobilized protein employed is a protein immobilized on a base material which has a compound being attached thereto and having a group capable of binding to a base material for immobilizing a biomolecule or a support provided on the base material.

(57) 要約: 基材上にタンパク質を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、該タンパク質と相互作用し得る物質の検出を高感度で行う方法、ならびにこれらの方法に用いるタンパク質及びタンパク質固定化基材を提供することを課題とする。本発明の固定化タンパク質を用いた該タンパク質と相互作用し得る物質の検出法においては、生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物が結合したタンパク質であって、基材上に固定化されたタンパク質を固定化タンパク質として用いる。



WO 2005/085857 A1

## 明 細 書

### 固定化生体分子及び生体分子と相互作用し得る物質の検出法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、固定化生体分子を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出に関し、詳しくは、固定化生体分子を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法、並びに同方法に用いる生体分子及び生体分子固定化基材に関する。

#### 背景技術

- [0002] 従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、イムノアッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されており、これらの技術の中でタンパク質の固定化法として以下のものが知られている（非特許文献1）。
- [0003] (1) ニトロセルロースメンブレンあるいはポリ-L-リジン上にタンパク質を物理的に吸着させる方法。
- (2) ガラス等の基板表面にアルデヒド基あるいはエポキシ基を導入した基板を作製し、これら官能基とタンパク質のアミノ基を反応させ、固定する方法。
- (3) 金基板上に二官能チオールアルキレンを用いてタンパク質を固定する方法。
- [0004] しかしながら、(1)の方法では固定反応に物理吸着を利用しているため、タンパク質が基材から剥がれやすく、また、非特異的な吸着により高いバックグラウンドノイズが観測される欠点がある。
- [0005] また、(2)の方法では、共有結合を形成するためタンパク質が基材表面から剥がれる欠点を克服できるが、固定反応を行う場合に有害な還元剤等の試薬を必要とし、また、再現性のあるデータを得るためには熟練の操作を必要とする。
- [0006] さらに、(3)の方法では、金-チオール間の結合が物理吸着であることやチオール基自体の安定性が乏しいことが再現性のある定量的なデータを得ることを困難にしている。
- [0007] また、核酸の固定化法として核酸にヌクレオチドポリマー等を結合させ、紫外線照射等により固定化用基材に結合させる技術が知られている（特許文献1）。

非特許文献1:Zhu, H. and Snyder, M. (2003) Protein chip technology. Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 55-63.

特許文献1:特開2001-281246号公報

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、基材上に生体分子を簡便に効率よく、かつ、簡易に固定化する方法、及び生体分子と相互作用し得る物質の検出を高感度で行う方法、及びこの方法に用いる生体分子及び生体分子固定化基材を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 上記課題を解決するため、検討を行った結果、生体分子に、不飽和結合を有する化合物を含むポリマー又は光反応性基を有する化合物が結合した生体分子が、強固に固定化できること、さらにこのようにして生体分子を基材に固定化したものを用いると、該生体分子と相互作用し得る物質の検出感度を向上できることを見出し、本発明の完成に至った。
- [0010] すなわち本発明は、以下の通りである。
- (1) 固定化生体分子(ただし、核酸を除く)を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法に用いられる固定化される生体分子であって、該生体分子が固定化される生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物が結合した生体分子。
  - (2) 前記生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物が不飽和結合を有する化合物を含むポリマーである(1)に記載の生体分子。
  - (3) 前記ポリマーの平均重合度が2以上で1000000以下である(2)に記載の生体分子。
  - (4) 前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである(2)又は(3)に記載の生体分子。
  - (5) 前記生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物がナイトレン前駆体、カルベン前駆体又はケトン基を有する化合物から選ばれる、少なくとも一つの光反応性基を有する化合物である(1)に記載の生体分子。

(6) 前記生体分子が、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素から選ばれる(1)〜(5)のいずれかに記載の生体分子。

(7) 生体分子固定化用基材と、この基材上に固定化された(1)〜(6)のいずれかに記載の生体分子とを有する生体分子固定化基材。

(8) 生体分子固定化用基材と(1)〜(6)のいずれかに記載の生体分子を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む生体分子固定化基材の製造法。

(9) 固定化生体分子を用いた該固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法において、(7)記載の生体分子固定化基材を用いることを特徴とする固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法。

### 発明の効果

[0011] 本発明により、安定に基材又は基材上の担体上に固定化できる生体分子が提供される。任意の生体分子に基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物を付加することにより、基材又は基材上の担体上に固定できる任意の生体分子の量を増やすことができるため、検出感度を向上できる。

### 発明を実施するための最良の形態

[0012] 以下に、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

#### <1>生体分子

本発明の生体分子は、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物が結合した生体分子である。生体分子としては、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素等が挙げられる。

[0013] 以下、生体分子としてタンパク質を例として説明するが、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物を結合させること以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用して本発明を実施することができる。

[0014] 本発明のタンパク質は、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物が結合していること以外は、通常の固定化(固相化)タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法(例えば、イムノアッセイ等)等に用いられる固定化タンパク質と特に変わることは無く、タンパク質と相互作用

し得る物質との結合が可能なタンパク質であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のタンパク質が挙げられる。また、タンパク質の大きさは、タンパク質と相互作用し得る物質との結合が可能な大きさであれば特に制限されない。

- [0015] タンパク質において、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物が結合する部分は、タンパク質のアミノ末端又はカルボキシ末端、側鎖アミノ基、側鎖カルボキシキル基、側鎖チオール基、側鎖アルコール基等の部分である。
- [0016] タンパク質に生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物を結合させる方法としては、公知の方法を用いることができる。このような方法としては、例えば、市販のクロスリンク試薬を用いてタンパク質に該化合物を結合させる方法やタンパク質が有する官能基と該官能基と反応性を有する原子、官能基又は構造とを反応させることによりタンパク質に該化合物を結合させる方法を挙げることができる。
- [0017] クロスリンク試薬を用いてタンパク質に生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物を結合させる方法としては、例えば、以下の方法等が挙げられる。市販されているペプチド合成機を用いて、目的とするペプチドを合成する。ポリマーを構成する化合物として、市販されている核酸合成機を用いて、アデニン、シトシン、チミン、ウラシル等の核酸塩基を有するヌクレオチドから選ばれる1種又は2種以上が少なくとも2塩基以上重合したヌクレオチドを合成し、市販のアミノ基導入試薬を用いてアミノ基を導入する。前記ペプチドとアミノ基が導入されたヌクレオチドを、市販のクロスリンク試薬(例えば、DSS (Disuccinimidyl suberate) 等)を用いて、常法に従って結合させる。
- [0018] また、糖に生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物を結合させる方法としては、例えば、以下の方法等が挙げられる。グルコースの6位の水酸基をトリチル基で保護した後、残りの水酸基をアセチル化し、6位にアジド基を導入した後、アミノ基に変換する。次いで、アミノ化グルコースにDSSを大過剰量加え、精製する。次いで、例えば、上記のように合成した5'末端あるいは3'末端アミノ基が導入されたポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシ

チミジル酸、ポリデオキシウリジル酸等のヌクレオチド又はこれらの複合ポリマーを、上記アミノ化グルコースのスクシニミジル基に反応させる。ナトリウムメトキシドを用いて脱アセチル化を行い、ポリマーが導入されたグルコースを合成する。

[0019] タンパク質が有する官能基と反応性を有する原子、官能基又は構造として、具体的には、以下のものを挙げることができる。アミノ基と反応する原子、官能基又は構造としては、イソチオシアネート基、スクシンイミドエステル、スルホニルスクシンイミドエステル等に含まれるイミドエステル基、ハロゲン化スルホニル基、ハロゲン化アルキル等に含まれるハロゲン、イソシアネート基、窒素イペリット等に含まれるハロゲン化アルキル基、プラチナ錯体、カルボジイミド基、アルデヒド基、アジド基、オキシイミノフェニルアセトニトリル等に含まれるシアノ基、ジメチルチオピリミジン等に含まれるメチルチオ基、ジカルボナート等に含まれるジエステル基等；

カルボキシル基と反応する原子、官能基又は構造としては、ジアゾアルカン等に含まれるジアゾ基、ハロゲン化アルキル等に含まれるハロゲン、トリフルオロメタンスルホネート等に含まれるスルホニル基、カルボジイミド基、ヒドラジン等に含まれるヒドラジノ基、フェナシルエステル等に含まれるフェナシル基、4-スルホ-2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェノール等に含まれる水酸基、アルキルトリフルオロメタンスルホネート等；

チオール基と反応する原子、官能基又は構造としては、ヨードアセトアミド等に含まれるヨウ素、マレインイミド等に含まれるイミド基、アルキルハライド等に含まれるハロゲン、アジリジン等に含まれるアジリジノ基、エポキシ基、シンメトリックジサルファイド等に含まれるジスルフィド基、ビニルスルホン等に含まれるビニル基、プロモピルビン酸等に含まれる臭素等；

アルコール基と反応する原子、官能基又は構造としては、2-オキシニトリル、酸クロライド、イソシアネート基等を挙げることができる。

[0020] タンパク質が有する官能基と該官能基と反応性を有する原子、官能基又は構造とを反応させることによりタンパク質に該化合物を結合させる方法として、例えば、以下の方法等が挙げられる。炭酸セシウム、ナトリウム、カルボジイミド、塩化チオニル等を用いて、タンパク質中のカルボキシル基を活性化した後、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物中のハロゲン又はアミノ基を常

法に従って反応させる。

- [0021] さらに、本発明のタンパク質としては、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物、すなわち、不飽和結合を有する化合物を含むポリマーあるいは光反応性基を有する化合物を結合させたアミノ酸を、基材又は基材上の担体上に予め後に記載する電磁波を照射すること等により固定して、さらに、Spot synthesis法(Heine N, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Wenschuh H: A modular approach to the spot synthesis of 1,2,5-trisubstituted hybridizations on cellulose membranes. Tetrahedron Lett 2001, 42:227-230.)、フォトソングラフィー技術(Fodor SPA, Read JL, Pirrung LC, Stryer L, Lu AT, Solas D: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science 1991, 251:767-773.)や Fmoc法(Hasegawa K, Sha YL, Bang JK, Kawakami T, Akaji K, Aimoto S: Preparation of phosphopeptide thioesters by Fmoc- and Fmoc(2-F)-solid phase synthesis. Lett Pept Sci 2002, 8:277-284.)等を用いて、基材又は基材上の担体上に固定したアミノ酸に新たに複数の任意のアミノ酸を結合(伸長)させることもできる。
- [0022] 生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物における、基材又は基材上の担体上に結合し得る基とは、基材又は基材上の担体と反応性を有し、共有結合等の強固な結合を形成するものであれば特に制限されない。基材又は基材上の担体上に結合し得る基は、化合物中に、タンパク質がタンパク質固定化用基材に固定化されるのに十分に含まれていればよく、一つ又は複数であってよい。このような生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物としては、例えば、不飽和結合を有する化合物を含むポリマー、光反応性基を有する化合物等を挙げることができる。
- [0023] 不飽和結合を有する化合物を含むポリマーとは、ポリマーを構成するモノマーの少なくとも一つが不飽和結合を有する化合物を含むポリマーを意味する。不飽和結合を有する化合物は、タンパク質がタンパク質固定化用基材に固定化されるのに十分に含まれていればよい。また、ポリマーを構成するモノマーの全てが不飽和結合を有する化合物であってもよい。なお、「不飽和結合を有する化合物を含む」とは、不飽和結合を含む化合物の残基からなる又は該残基を含むことを意味する。

- [0024] ポリマーの長さとしては、その平均重合度が2〜1000000であることが好ましく、5〜100000であることがより好ましく、7〜1000であることが特に好ましい。
- [0025] この平均重合度が1以下であると、十分な量のタンパク質を担体上に固定できないことがあり、また、重合度が1000001以上であると、立体障害のため標的分子がタンパク質に接近できず、測定を妨げることがある。
- [0026] ポリマーとしては、具体的には、アデニン、アデニン誘導体、シトシン、シトシン誘導体、グアニン、グアニン誘導体、チミン、チミン誘導体、ウラシル、ウラシル誘導体を塩基として有するヌクレオチド、アクリル酸又はメタクリル酸のエステル系モノマー、スチレン系モノマー、ポリオレフィン系モノマー、ビニル系モノマー、ニトリル系モノマー、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、テトラエチレングリコールジアクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、テトラメチロールプロパンテトラアクリレート、ジペンタエリスリトールペンタアクリレート等から選ばれるモノマーが含まれるポリマーが挙げられ、ポリマー中の上記モノマーの種類は同一又は異なってもよい。好ましいモノマーはヌクレオチドであり、特に好ましいモノマーはアデニンを塩基として有するヌクレオチド、シトシンを塩基として有するヌクレオチド、チミンを塩基として有するヌクレオチド、ウラシルを塩基として有するヌクレオチドである。
- [0027] 光反応性基を有する化合物において光反応性基とは、光を照射することにより、基材又は基材上の担体と高い反応性を有する基を生じる基を意味する。
- [0028] 光反応性基を有する化合物としては、一分子又は光反応性基を有する化合物を含むポリマーであってもよい。光反応性基を有する化合物を含むポリマーとは、ポリマーを構成するモノマーの少なくとも一つが光反応性基を有する化合物を含むポリマーを意味する。光反応性基を有する化合物は、タンパク質がタンパク質固定化用基材に固定化されるのに十分に含まれていればよい。また、ポリマーを構成するモノマーの全てが光反応性基を有する化合物であってもよい。
- [0029] 光反応性基としては、具体的には、ナイトレン前駆体、カルベン前駆体又はケトン基等が挙げられる。ここで前駆体とは、ナイトレン、カルベン等の活性種を発生し得る基を意味する。光反応性基を有する化合物は、各種光反応性基のうちの任意の1又は2以上の光反応性基を含むものである。光反応性基を有する化合物としては、具



体的には、アリルケトン、アジド又はジアゾ化合物等を挙げることができる。

[0030] 生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物には、固定化した生体分子が標的分子と立体的に十分に接近できるように固定化する生体分子と基材表面の距離を適切に保つために、スペーサー化合物を導入してもよい。このスペーサー化合物としては、生体分子及び光生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物と結合し得る非光反応性原子、官能基又は構造を有する化合物を用いることができる。非光反応性原子、官能基又は構造を有する化合物としては、例えば、アルキル基、シクロアルキル基、ハロゲン、ヒドロキシル基、エーテル基(ハロエーテル基を含む)、アルデヒド基、カルボニル基、エステル基、アミド基、イミド基、カルボキシ基、スルホニル基、ホスホニル基、ニトロ基、アミノ基、チオール基等から選ばれる任意の原子、官能基又は構造を2以上含む化合物であれば特に制限されない。

[0031] なお、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物としては、上記した光反応性基を有する化合物と不飽和結合を有する化合物を含むポリマーを含むものであってもよい。

[0032] 本発明の生体分子には、生体分子固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物とともに、さらにビニル化デオキシグアノシン、ビニル化デオキシグアノシン誘導体、ソラレン、ソラレン誘導体(4'5'-ジヒドロソラレン、4,5'8-トリメチルソラレン、アンゲリシン等)等の光架橋剤を導入してもよく、このような光架橋剤を用いて生体分子を三次元的に固相担体上に固定することもできる。

[0033] <2>タンパク質固定化用基材

本発明のタンパク質固定化用基材に用いる基材は、タンパク質固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物と反応性を有し、化学結合によってこれらの化合物が結合したタンパク質を固定化することができ、通常の固定化タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法等の条件に耐えうるものであれば特に制限されない。具体的には、タンパク質の固定及び固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法等に用いる溶剤に不溶であり、かつ常温若しくはその付近の温度範囲内(例えば0〜100℃)で固体又はゲル状であるものが挙げ

られる。尚、基材が溶剤に不溶性であるとは、基材に後述のようにしてカルボジイミド基等のタンパク質に結合性を有する基を有する担体が担持され、次いでタンパク質が固定化され、その後、例えば、プロテインチップ等として使用される際の各過程で用いられる水性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤に実質的に不溶性であることをいう。

[0034] このような基材の材質として、具体的には、プラスチック、無機高分子、金属、セラミック等が挙げられる。

[0035] 上記プラスチックとして具体的には合成樹脂(熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、共重合体等)及び天然樹脂を挙げることができる。

[0036] より具体的に、熱可塑性樹脂としては、ポリカルボジイミド、アイオノマー(スチレン系、オレフィン系)、ポリノルボルネン、ポリアセタール、ポリアリレート、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレンオキサイド、ポリオキシメチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブタジエン、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンスルフィド、ポリオキシベンゾイル、ポリオキシエチレン、酢酸セルロース、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブチレン、セルローストリアセテート、ポリ-p-フェニレンテレフタラミド、ポリイソブレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルペンテン、塩素プラスチック(ポリ塩化ビニル、ポリ塩化エチレン、塩素化ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン)、フッ素プラスチック(テトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン)、ニトロセルロース、ポリアミド(ナイロン6、ナイロン66)、ポリアミドイミド、ポリイミド(熱可塑性ポリイミド、ポリエーテルイミド)、ポリエチレンプラスチック(塩素化、高密度、低密度)、ポリビニルプラスチック(ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリパラビニルフェノール、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール)、液晶ポリマー(ポリエステル系液晶高分子)、アクリレートプラスチック(アミノポリアクリルアミド、ポリアクリルアミド、ポリメチルメタクリレート、エチルポリメタクリレート、ブチルポリメタクリレート)、熱可塑性エラストマー(スチレン系、オレフィン系、ウレタン系、ポリエステル系、ポリアミド系、1, 2-ポリブタジエン系、塩化ビニル系、フッ素系、ポリアイオノマー系、塩素化ポリエチレン系、シリコン系)等を挙

げることができる。

[0037] より具体的に、熱硬化性プラスチックとしては、エポキシ、ポリキシレン、ポリグアナミン、ポリジアリルフタレート、ポリビニルエステル、ポリフェノール、不飽和ポリエステル、ポリフラン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリマレイン酸、メラミン、ユリア、アルキド、ベンゾグアナミン、ポリシアナート、ポリイソシアナート等を挙げることができる。

[0038] また、プラスチックとしては、共重合体を用いることもでき、より具体的に、共重合体としては、イソブチレン無水マレイン酸共重合体、アクリロニトリルアクリレートスチレン共重合体、アクリロニトリルEPDMスチレン共重合体、アクリロニトリルスチレン共重合、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ブタジエンスチレンメチルメタクリレート共重合体、エチレン塩化ビニル共重合体、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレンーエチルアクリレート共重合体、アクリロニトリルーブタジエンスチレン共重合体、ポリエーテルエーテルケトン共重合体、フッ化エチレンポリプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレンパーフロロアルキルビニルエーテル共重合体、テトラフルオロエチレンエチレン共重合体等を挙げることができる。

[0039] さらに、より具体的に、天然樹脂としては、セルロース、ロジン、コーバル、ダンマル、カナダバルサム、エレミ、サンダラック、グッタベルカ、ウルシ、シュラック、コハク、じん皮繊維、葉脈繊維、果実繊維、獣毛繊維、繭繊維、羽毛繊維、キチン、キトサン、石綿、アスベスト及びこれらの誘導体等を挙げることができる。

[0040] また、上記合成樹脂に、染料、発色剤、可塑剤、顔料、重合禁止剤、表面改質剤、安定剤、密着性付与剤、熱硬化剤、分散剤、紫外線劣化防止剤等を必要に応じて添加した合成樹脂を用いることができる。さらに、前記合成樹脂としては、形状を保持するために異なる種類の前記合成樹脂を積層させていてもよく、単一合成樹脂であってもよい。また、前記合成樹脂を2種類以上混合したポリマーアロイであってもよい。

[0041] また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

[0042] また、金属として好ましくは、周期律表第2周期ー第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金が挙げられる。

。

[0043] 上記周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン、金、銅、ニッケル等が挙げられる。

[0044] また、上記合金として具体的には、洋白(成分:Cu, Ni, Zn)、真鍮(成分:Cu, Zn)、ブロンズ(成分:Cu, Be)、モネル(成分:Cu, Ni, Fe, Mn)、ニッケルコバルト合金(成分:Ni, Co)、ニッケルクロム合金(成分:Ni, Cr)、コバルト合金(成分:Co, Ni, Cr)、ステンレス(成分:Ni, Cr, Fe)、銀タングステン(成分:Ag, W)、bチタン(成分:Ti, V, Al)、abチタン(成分:Ti, V, Al)、NT合金(成分:Ti, Ni)、アルミニウム合金(成分:Al, Cu, Mg, Si, Mn, Zn)、ジュラルミン(成分:Al, Cu, Si, Fe, Mn, Mg, Zn)、マグネシウム合金(成分:Mg, Al, Zn)、K24(成分:Au)、K18(成分:Au, Ag, Cu)、ベリリウム銅(成分:Cu, Be)、鑄鉄(成分:Fe, Mn, S, C)、炭素鋼(成分:Fe, C, Si, Mn, P, S)、青銅鑄物(成分:Cu, Sn, Zn, Pb)、りん青銅鑄物(成分:Cu, Zn, P)、黄銅鑄物(成分:Cu, Zn, Pb)、マンガン黄銅(成分:Cu, Zn, Mn, Fe, Al)、シルジン青銅鑄物(成分:Cu, Si, Zn)、アルミニウム青銅鑄物(成分:Cu, Al, Fe, Ni, Mn)、エリンバー(成分:Ni, Cr, Mn)、エリンバーエクストラ(成分:Ni, Cr, Co, Mn)、インバー(成分:Ni, Fe)、スーパーインバー(成分:Fe, Ni, Co)、ステンレスインバー(成分:Fe, Co, Cr)、Malottes(成分:Sn, Bi, Pb)、リポウィッツ(Lipowitz)(成分:Sn, Bi, Pb, Cd)、ウッズ(Wood's)(成分:Sn, Bi, Pb, Cd)、マンガニン(成分:Cu, Mn, Ni, Fe)、イザベリン(成分:Cu, Mn, Al)、コンスタンタン(成分:Cu, Ni)、アルクレス(成分:Fe, Cr, Al)、カンタル(成分:Cr, Fe, Al, Co)、アルメル(成分:Ni, Al)、磁性材料(Fe, Ni, Co等強磁性遷移元素を含む材料)、パーマロイ(成分:Fe, Ni)、アルパーム(成分:Fe, Al)、フェライト( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ を主成分とする複合酸化物)、センダスト(成分:Fe, Si, Al)、スーパーセンダスト(成分:Fe, Si, Al, Ni)、アルニコ(成分:Fe, Al, Ni, Co)、水素吸蔵金属(ランタンニッケル合金(成分:La, Ni)等)、Co-Cr系合金、 $\text{SnO}_2$ 系酸化物、Nb-Ti合金、制振合金(振動を低減もしくは吸収、振動の伝播を遮断する合金材料、Al-Zn超塑性合金、サイレントアロイ、ニチノール等)、電極用材料、半導体材料(シリコン、ゲルマニウム、カリウムヒ素等)等が挙げられる。

- [0045] また、前記金属は、他の金属で蒸着又はメッキ処理(加工)されていてもよい。さらに、前記金属は、形状を保持するために異なる種類の前記金属を積層させていてもよく、単一金属であってもよい。
- [0046] 本発明における基材として上記金属を用いる場合、基材が金属のみから構成されていてもよいし、非金属材料上に金属が接着、蒸着又はメッキ等により積層されていてもよい。
- [0047] また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。
- [0048] 上記基材の形状は、特に問われないが、箔(フォイル)状、平板(プレート)状、薄片(ウェーハ)状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であってもよい。さらに、得られる結果の保存を容易にするため、平板等の裏面をシール等に使用できる材料(接着剤等)を塗布、コート等を行うことによって、シールとしても使用することもできる。また、それらの大きさについては、特に制限は無い。
- [0049] 上記基材にタンパク質を固定化するに当たって、基材にタンパク質を直接固定化してもよく、担体を基材に担持させて、担体を介してタンパク質を基材に固定化してもよい。担体としては、前述のタンパク質固定化用基材又は基材上の担体上に結合し得る基を有する化合物に結合性を有するものが使用できる。ここで、「担持」とは、担体にタンパク質を固定化する際やタンパク質固定化基材をプロテインチップ等として使用する際に用いられる水溶性溶剤、有機溶剤等の各種溶剤中で、基材から上記担体を実質的に脱離しないことを意味する。
- [0050] 本発明に用いられる上記担体は、上記基材上に担持される限り、単に物理的な接着性を利用して担持されていてもよく、また、化学的に共有結合等を介して担持されていてもよい。また、上記担体は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよい。
- [0051] 担体としては、有機低分子、プラスチック、無機高分子、金属、セラミック等が挙げられる。
- [0052] 上記有機低分子として具体的には、ポリリジン、3-アミノトリエトキシアミノシラン、3-

アミノトリメトキシアミノシラン等の一級アミノ基を有するシランカップリング剤、マレインイミド、スクシンイミドエステル等のイミド基含有化合物、カルボジイミド基含有化合物、イソシアネート基含有化合物、イソチオシアネート基含有化合物、窒素イペリット基含有化合物、アルデヒド基含有化合物、アミノ基含有化合物、カルボキシシル基含有化合物、ハロゲン含有化合物等が挙げられる。

[0053] また、プラスチックとして具体的には、基材材料として上記したような合成樹脂（熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂、共重合体等）及び天然樹脂を用いることができる。

[0054] また、無機高分子として具体的には、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル及びグラファイト等が挙げられる。

[0055] また、金属として好ましくは、基材材料として上記したような周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属、又は同金属を含む合金を用いることができる。

[0056] 上記周期律表第2周期～第7周期のI、II、III、IV、V、VI、VII、VIII族および遷移元素から選ばれる金属として特に好ましいものとしては、アルミニウム、チタン、白金、タングステン、モリブデン、金、銅、ニッケル等が挙げられる。

[0057] また、セラミックとして具体的には、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ素及び炭化ホウ素等が挙げられる。

[0058] このような担体は、上記基材に対して高い接着性を有するものであり、この接着性を利用して基材に担持されるものである。尚、前記担体が基材上に物理的な接着性を利用して担持される際の代表的な形態は皮膜である。

[0059] 前記基材上に前記担体を皮膜で担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコータを用いたコーティング等の公知の方法を用いることができる。

[0060] 例えば、ガラス基材の表面全体にカルボジイミド基（樹脂）を導入する方法については、まず、3-アミノプロピルトリエトキシシラン等のアミノ置換オルガノアルコキシシランを適当な溶媒に溶解して得られた溶液に70～80℃程度の温度条件下でガラス基材を概ね2～3時間程度浸漬した後、これを取り出して水洗し、さらに、100～120℃程度で約4～5時間加熱乾燥する。乾燥後、適当な溶媒中に浸し、カルボジイミド樹脂

を加え30〜170℃程度の温度条件下で12時間程度攪拌し、洗浄すればよい。また、上記3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基と窒素イペリット基のタンパク質結合基以外の官能基を適当な溶媒を用いて反応させ、ガラス基材の表面に窒素イペリット基を導入することもできる。

[0061] また、ガラス基材にアミノ基以外の官能基を導入する場合や、基材がガラス以外の材料からなる場合においても、上記基材の説明で挙げた各種材料表面に種々の官能基を導入することは、従来より一般的に行われていることであり、その方法も公知であるので、このような公知の方法を用いて基材表面への官能基の導入を行うことができる。

[0062] さらに、上記で挙げた基材のプラスチック基材の中には、基材表面に既に上記のような官能基を有するものもあり、この場合には基材表面に官能基を導入することなしに、これをそのまま担体の製造に用いることも可能である。また、このようなプラスチック基材であってもさらに官能基を導入して上記担体の製造に用いることも可能である。

[0063] また、上記担体又は基材、あるいは担体及び基材の材料に公知の光重合開始剤を混合することもできる。光重合開始剤を混合することによって、紫外線等の電磁波の照射によるタンパク質の固定化の際の反応性が向上し得る。

[0064] <3>タンパク質固定化基材

上記担体の所定の位置に、タンパク質の溶液をスポットする。タンパク質としては、上記<1>で挙げたタンパク質が特に制限無く挙げられる。

[0065] タンパク質を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常タンパク質溶液の調製に用いられる緩衝液、例えばTris緩衝液、PBS緩衝液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、リン酸を含む水溶液、食塩を含む水溶液等の他、カルボキシル基、スルホン基、ホスホン基を含む化合物から選ばれるアニオンと、アルカリ金属イオン、アルカリ土類金属イオン、オニウムイオンから選ばれるカチオンとを含む溶媒を用いることができる。同アニオンとカチオンとを含む溶媒を用いることにより、電磁波を用いてより効率よくタンパク質を担体に固定化することができる。同アニオンとカチオンとを含む溶媒として、具体的には、例えば、カルボン酸塩を

含む水溶液(クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等)、スルホン酸塩を含む水溶液(ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等)、ホスホン酸塩を含む水溶液等(リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等)等を挙げることができる。また、タンパク質溶液の濃度も特に制限されないが、通常1 mmol/ $\mu$ l〜1 fmol/ $\mu$ l、好ましくは100  $\mu$ mol/ $\mu$ l〜100 fmol/ $\mu$ lの濃度である。

- [0066] タンパク質溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットでタンパク質溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポッタを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、タンパク質溶液をスポットした位置を把握することができる程度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl〜10mlである。タンパク質溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされるタンパク質溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体にタンパク質が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識したタンパク質を固定化しておいてもよい。
- [0067] タンパク質溶液を担体上にスポットした後に、電磁波、好ましくは紫外線を照射する。また、前記タンパク質溶液をスポット後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記タンパク質溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30〜100℃、好ましくは35〜45℃である。
- [0068] 不飽和結合を有する化合物を用いてタンパク質を固定化する場合、担体、少なくとも担体のタンパク質を固定した部位に照射する紫外線としては、波長240〜380nmの成分を含む紫外線等を好ましく挙げることができる。具体的には、波長254nm又は335nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。照射量は、累積照射量として通常20〜2400mJ/cm<sup>2</sup>、好ましくは50〜900mJ/cm<sup>2</sup>である。
- [0069] 光架橋剤及び／又は光反応性基を有する化合物を用いてタンパク質を固定化する場合、担体、少なくとも担体のタンパク質を固定した部位に照射する紫外線の波長、照射量等は用いる光架橋剤及び／又は光反応性基を有する化合物に応じて、適宜決定することができる。
- [0070] 本発明のタンパク質固定化用基材は、これを用いて分析等を行う際に、上記固定化タンパク質以外のタンパク質等を接触させる機会が多いが、基材又は基材上の担



体に担持された未反応タンパク質固定部分に上記固定化タンパク質以外のタンパク質等が非特異的に結合することを防ぐため、上記のようにして点状にタンパク質を基材又は基材上の担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等を基材又は基材上の担体に接触させ、未反応タンパク質固定部分をブロックしておくことが好ましい。

[0071] 本発明のタンパク質固定化基材を用いた検出法により検出される物質は、前記タンパク質固定化用基材上に固定化された固定化タンパク質と相互作用し得る物質であれば特に制限されない。なお、「相互作用」とは、固定化タンパク質とある物質間において、共有結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合及び静電気による結合等により生じる分子間における作用であり、特に限定されない。

[0072] このようにして得られる本発明のタンパク質固定化基材は、前記タンパク質が担体に非常に強固に担持されたものであり、固定化タンパク質を用いた固定化タンパク質と相互作用し得る物質の検出法(例えば、イムノアッセイ等)等で広く使用されている洗浄方法(界面活性剤を用いた洗浄方法等)によっても脱離することがなく、これを用いて分析等を行った場合、再現性及び定量性に優れた分析が可能となる。また、本発明のタンパク質固定化基材は、タンパク質が、大きさや種類に制限されずに固定され得るので、同一基材上で種々のタンパク質を同時に取り扱うことができる。

[0073] これらのことから、本発明のタンパク質固定化基材は、プロテインチップ(プロテインマイクロアレイ)等に優れた性能を持って適用可能であるといえる。

### 実施例 1

[0074] <クエン酸二アンモニウム水溶液を溶媒としたペプチド溶液の担体への固定化、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価>

常法に従い、ペプチド合成機を用いて、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチド(7残基)を合成した。さらに、配列番号2で示すチロシンをリン酸化したペプチド(7残基)も合成した。なお、ペプチド合成の詳細については、ペプチド合成の基礎と実験(丸善株式会社)を参照した。次いで、配列番号3に示すオリゴヌクレオチド(10残基)の5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを定法に従い合成した。

[0075] 上記合成ペプチド及び上記オリゴヌクレオチドを等モルずつリン酸バッファー(p

H7.5)に溶解し、10倍モルのDSS(ピアス社製)を加えて、37℃にて2時間インキュベートした。次いで、NAP5カラム(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いて精製・濃縮し、45mMクエン酸二アンモニウム水溶液に溶解してペプチド溶液(1 pmol/ $\mu$ l)を調製した。

- [0076] 担体上の所定の位置に、前記ペプチド溶液をスポットした。スポット量は、それぞれ0.5  $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400(ストラタジーン社製、中心波長254nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、600mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は240秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。
- [0077] 一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液(クエン酸二ナトリウム水溶液)も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。
- [0078] 担体として、カルボジイミド基を有する高分子化合物で処理したガラス基材を用いた。
- [0079] 上記担体の試料固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液(1  $\mu$ g/100  $\mu$ l 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS(モレキュラープローブス社製)を用いて0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9)中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体(コスモバイオ社製)に導入したものをを用いた。次いで、上記担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0080] リン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(ペプチドを含まないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 2

- [0081] <タンパク質の担体への固定化、タンパク質固定化担体の抗体反応による評価>  
Protein G(フナコシ社製)及びBSA(シグマアルドリッチ社製)各500  $\mu$ gをリン酸バッファー(pH7.5)及びDMF(N,N-dimethylformamide)(1:1 vol/vol)混合溶液(2ml)に溶解し、等モルの配列番号4に示すポリチミン誘導体の5'末端にアミノ基を導入したオリ

ゴヌクレオチド(グレンリサーチ社製,12塩基)及び10倍モルのDSS(ヒアス社製)を加えて、4℃にて10時間インキュベートした。次いで、NAP5カラム(アマシヤムバイオサイエンス社製)を用いて精製し、タンパク質溶液(50  $\mu$ g/ml)を調製した。ガラス板に金蒸着させた担体の所定の位置に、前記タンパク質溶液をスポットした。スポット量は、それぞれ0.5  $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、CRM-FA Spectro Irradiator (JASCO社製)を用い、中心波長335 nmの紫外線を照射した。このときの照射強度は、1.5mW/cm<sup>2</sup>であり、照射時間は120秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとして紫外線を照射していない担体も作製した。

[0082] 上記タンパク質固定化担体のタンパク質固定部分に、Cy3標識抗Protein G IgG(アマシヤム バイオサイエンス社製)を含む溶液(1  $\mu$ g/200  $\mu$ l IgG, 1×PBS, 0.2% TritonX-100)を載せ、5時間インキュベートした。次いで、上記タンパク質固定化担体を1×PBS-0.2% TritonX-100溶液で洗浄し、ScanArray 4000(GSI社製)を用いて蛍光を測定した。

[0083] 紫外線を照射した担体上のProtein Gを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、タンパク質が確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット及びBSAを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

### 実施例 3

[0084] <光架橋剤を用いたペプチドの担体への固定化、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価>

実施例1で作製したペプチド溶液(1pmol/ $\mu$ l) 100  $\mu$ lにソラレン(モレキュラープローブ社製)溶液(200  $\mu$ g/ml)を0.1ml加えよく混合し、ソラレン含有ペプチド溶液(ペプチド0.5pmol/ $\mu$ l)を調製した。次いで、カルボジイミド基を有する高分子化合物で処理したガラス担体上の所定の位置に、前記ペプチド溶液をスポットした。スポット量はそれぞれ0.5  $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、HPW125 Philips Lamp (Philips Lighting社製)(中心波長365 nm)を $2.9 \times 10^{16}$  quanta/secのエネルギーで60分間照射し、さらに、Uvstratalinker 2400(ストラタジーン社製、中心波長

254 nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、300mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は120秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。

[0085] 一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液(クエン酸二ナトリウム水溶液)も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

[0086] 上記担体の試料固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液(1  $\mu$ g/100  $\mu$ l 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS(モレキュラープローブ社製)を用いて0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9)中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体(コスモバイオ社製)に導入したものをを用いた。次いで、上記担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。

[0087] リン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(ペプチドを含まないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

#### 実施例 4

[0088] <ペプチドの担体への固定化、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価>

ペプチド合成機を用いて、配列番号5に示すアミノ酸配列を有するペプチド(8残基)及び配列番号6で示すセリンをリン酸化したペプチド(8残基)を合成した。これらペプチドのN末端を常法に従い、固相担体上(2-クロロトリチルクロライド レジン)でアセチル化した。側鎖の保護基[BOC(t-ブトキシカルボニル)基及びt-Bu(t-ブチル)基]を有したままのこれらペプチドを酢酸:トロフルオロエタノール:ジクロロメタン溶液(1:2:7 vol/vol)を用いて固相担体上から切り離した。これらペプチドをDMF中で1,3-ジイソプロピルカルボジイミド, 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール, N,N-ジイソプロピルエチルアミン及び4-ジメチルアミノピリジンを用いて、常法に従い、ペプチドのC末端に、配列番号4に示すポリチミン誘導体の5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを導入した。次いで、ペプチドの保護基をトリフルオロ酢酸:水:ジエタンジチオール:チオアニソール:フェノール溶液(10 ml:0.5 ml:0.25 ml: 0.5 ml: 0.75 g)を用いて脱保護し、NAP5カラム(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いて精製・濃縮し、50mM

リン酸水溶液(pH 8.5)に溶解してペプチド溶液(1pmol/ $\mu$ l)を調製した。

- [0089] カルボジイミド基を有する高分子化合物で処理したガラス担体上の所定の位置に、前記ペプチド溶液をスポットした。スポット量は、それぞれ0.5 $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、CRM-FA Spectro Irradiator (JASCO社製)を用い、中心波長335 nmの紫外線を照射した。このときの照射強度は、1.5mW/cm<sup>2</sup>であり、照射時間は120秒であった。照射時間は60秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとして紫外線を照射していない担体も作製した。
- [0090] 上記ペプチド固定化担体のペプチド固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液(1 $\mu$ g/100 $\mu$ l 抗体, 1 $\times$ PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS(モレキュラープローブス社製)を用いて0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9) 中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体(コスモバイオ社製)に導入したものを用いた。次いで、上記ペプチド固定化担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0091] 紫外線を照射した担体上のリン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 5

- [0092] <ペプチドの担体への固定化、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価>

実施例4で作製したペプチド溶液(1pmol/ $\mu$ l)を、アミノシランで処理したガラス担体(Telechem International社製)上の所定の位置にスポットした。スポット量は、それぞれ0.5 $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、CRM-FA Spectro Irradiator (JASCO社製)を用い、中心波長335 nmの紫外線を照射した。このときの照射強度は、1.5mW/cm<sup>2</sup>であり、照射時間は120秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとして紫外線を照射していない担体も作製した。

- [0093] 上記ペプチド固定化担体のペプチド固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液( $1\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$  抗体,  $1\times\text{PBS}$ , 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS(モレキュラープローブス社製)を用いて0.1M  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) 中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体(コスモバイオ社製)に導入したものを用いた。次いで、上記ペプチド固定化担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0094] 紫外線を照射した担体上のリン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

#### 実施例 6

- [0095] < 光反応性基によるペプチドの担体への固定化、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価 >
- 4-ベンゾイル安息香酸から4-ベンゾイル安息香酸クロライドを常法により合成した。4-ベンゾイル安息香酸クロライド(30g)をクロロホルム(500ml)に溶解し、6-アミノヘキサン酸溶液(17g/400ml 1N NaOH)を $0^\circ\text{C}$ にて滴下し、60分間室温にて攪拌した。反応混合溶液に12N HCl(40ml)を加え、有機溶媒層を抽出した。有機溶媒層を減圧濃縮し、乾燥した。次いで、得られた乾燥物に1,4-ジオキサン(500ml)を加えて、溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド(10.7g)、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(20.1g)を加え、室温にて18時間攪拌した。濾過後、溶液を減圧濃縮して、N-スクシンイミジル6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサノエートを25g得ることができた。
- [0096] 常法に従い、ペプチド合成機を用いて、配列番号5に示すアミノ酸配列を有するペプチド(8残基)を合成した。さらに、配列番号6で示すセリンをリン酸化したペプチド(8残基)も合成した。次いで、ペプチド(10nmol)に対して1M 炭酸水素ナトリウムバッファ(pH 9.0)(0.5ml)を加えて溶解し、DMFに溶解したN-スクシンイミジル6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサノエート(100nmol)を加えて、室温にて18時間攪拌した。次いで、NAP5カラム(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いて精製・濃縮し、50mMリ

ン酸水溶液(pH 8.5)に溶解してペプチド溶液(1pmol/ $\mu$ l)を調製した。

- [0097] 前記ペプチド溶液を市販のポリプロピレン担体(ポリプロピレンプレート:タキロン社製)上の所定の位置にスポットした。スポット量は、それぞれ0.5 $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、CRM-FA Spectro Irradiator (JASCO社製)を用い、中心波長335 nmの紫外線を照射した。このときの照射強度は、1.5mW/cm<sup>2</sup>であり、照射時間は120秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。また、コントロールとして、紫外線を照射していない担体も作製した。
- [0098] 上記ペプチド固定化担体のペプチド固定部分に、ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体を含む溶液(1 $\mu$ g/100 $\mu$ l 抗体, 1 $\times$ PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、5時間インキュベートした。ローダミン標識抗リン酸化アミノ酸抗体は、ローダミンNHS(モレキュラープローブス社製)を用いて0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9) 中でローダミンを抗リン酸化アミノ酸抗体(コスモバイオ社製)に導入したものを用いた。次いで、上記ペプチド固定化担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0099] 紫外線を照射した担体上のリン酸化ペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット及びリン酸化されていないペプチドを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 7

- [0100] <光反応性基によるタンパク質の担体への固定化、タンパク質固定化担体の抗体反応による評価>

Protein G(フナコシ社製)及びBSA(シグマアルドリッチ社製)各500 $\mu$ gに対して1M炭酸水素ナトリウムバッファー(pH9.0)(1ml)を加えて、実施例6で作製したN-スクシンイミジル6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサノエート(100nmol)DMF溶液を加えて、室温にて18時間攪拌した。次いで、NAP5カラム(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いて精製・濃縮し、50mMリン酸水溶液(pH 8.5)に溶解してタンパク質溶液(30 $\mu$ g/ml)を調製した。

- [0101] 得られたタンパク質を市販のポリカーボネート担体(一般ポリカーボネートプレート:タキロン社製)上の所定の位置にスポットした。スポット量は、それぞれ $0.5\mu\text{l}$ であり、スポット径の大きさは直径 $1\text{mm}$ であった。次いで、CRM-FA Spectro Irradiator(JASCO社製)を用い、中心波長 $335\text{ nm}$ の紫外線を照射した。このときの照射強度は、 $1.5\text{mW}/\text{cm}^2$ であり、照射時間は $120\text{秒}$ であった。その後、前記担体を水中で $30\text{分間}$ 振とうし、洗浄した後に乾燥させた。また、コントロールとして、紫外線を照射していない担体も作製した。
- [0102] 上記タンパク質固定化担体のタンパク質固定部分に、Cy3標識抗Protein G IgG(アマシャム バイオサイエンス)を含む溶液( $0.5\mu\text{g}/200\mu\text{l}$  IgG,  $1\times\text{PBS}$ ,  $0.2\%$  TritonX-100)を載せ、 $5\text{時間}$ インキュベートした。次いで、上記タンパク質固定化担体を $1\times\text{PBS}-0.2\%$  TritonX-100溶液で洗浄し、ScanArray 4000(GSI社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0103] 紫外線を照射した担体上のProtein Gを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、タンパク質が確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット及びBSAを含むスポット)では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 8

- [0104] <糖の担体への固定化、糖固定化担体のレクチンを用いた相互作用による評価>  
2-アミノエチルー $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(三谷産業株式会社製)及び配列番号7に示すデオキシチミジル酸とデオキシシチジル酸から構成されるポリマーの5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチド( $10\text{塩基}$ )をメタノール:イソプロピルアルコール:滅菌水:DMSO( $5:5:5:1$ )に溶解し、トリブチルアミン溶液(和光純薬社製)を加えて $\text{pH}$ を $8.0$ に調整した。次いで、 $2\text{倍モル}$ のDSS(ピアス社製)を加えて、 $42^\circ\text{C}$ にて $5\text{時間}$ インキュベートした。次いで、逆相HPLC(Waters社製,  $\mu\text{Bondasphere}$ , C8  $300\text{\AA}$ ,  $3.9\times 150$ )を用いて精製した後に濃縮し、 $45\text{mM}$ クエン酸二アンモニウム水溶液に溶解して糖溶液( $1\text{ pmol}/\mu\text{l}$ )を調製した。
- [0105] 平底型96-wellポリスチレン製マイクロタイタープレート(株式会社テックジャム社製)の所定の位置に、前記糖溶液及びバッファー溶液をそれぞれスポットした。スポット



量は、それぞれ0.5  $\mu$ lであり、スポット径の大きさは直径1mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400(ストラタジーン社製、中心波長254nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、80m J/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は30秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとして紫外線を照射していない担体も作製した。

- [0106] A. McPherson等 (McPherson, A.; Hankins, C. N.; Shannon, L. J. Biol. Chem. 1987, 262, 1791-1794)の方法に準じて作製したFITC標識レクチン(Sophora japonica由来)を1% BSAを含む1×PBST溶液に1 mMの濃度で溶解した。次いで、上記担体の糖固定部分に、FITC標識レクチンを含む溶液を載せ、室温で12時間インキュベートした。次いで、上記糖固定化担体を滅菌水で洗浄し、FLA 5000(富士写真フイルム社製)を用いて蛍光を測定した。
- [0107] 紫外線を照射した担体上のガラクトースを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、糖が確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(紫外線を照射していないスポット)では、バックグラウンドノイズ(バッファー溶液)と同じ強度の蛍光強度しか検出できなかった。

## 実施例 9

- [0108] <ペプチドのポリアクリルアミド担体への固定化、ペプチド固定化担体の酵素反応による評価>
- ペプチド合成機を用いて、配列番号8に示すアミノ酸配列を有するペプチド(6残基)を合成した。前記合成ペプチド及び配列番号7に示すオリゴヌクレオチド(10塩基)の5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを等モルずつ0.1M 炭酸水素ナトリウムバッファー(pH 8.0)に溶解し、DMFに溶解した10倍モルのDSS(ピアス社製)を加えて、37℃にて2時間インキュベートした。次いで、逆相HPLC (Waters社製、 $\mu$  Bondasphere, C8 300A, 3.9x150)を用いて精製した後に濃縮し、45mMクエン酸二アンモニウム水溶液に溶解してペプチド溶液(5 pmol/ $\mu$ l)を調製した。
- [0109] Nano-Plotter<sup>TM</sup> (GeSim社製)を用いて、前記ペプチド溶液をスライド表面にポリアクリルアミドを有する3D-Link<sup>TM</sup> Activated Slide (Surmodics社製)上にスポットした。スポット径の大きさは直径0.3 mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400(ストラタジーン社

製、中心波長254nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、60 mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は24秒であった。その後、前記担体を水中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液(クエン酸二ナトリウム水溶液)も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

[0110] 上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinase (Upstate社製)を含むバッファー[2 U/50  $\mu$ l 酵素, 25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100  $\mu$  M ATP]を載せ、5時間インキュベートした。次いで、上記試料固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FITC標識 anti-phosphotyrosine (シグマアルドリッチ社製)を含むバッファー(1  $\mu$ g/100  $\mu$ l 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1%BSA)を上記ペプチド固定化担体のペプチド固定部分に載せ、2時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FLA 5000(富士写真フイルム社製)を用いて蛍光を測定した。

[0111] 一方、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファー[25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100  $\mu$  M ATP]を載せ、5時間インキュベートし、前記FITC標識anti-phosphotyrosineを用いて2時間インキュベートしたペプチド固定化担体も作製した。

[0112] チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含むバッファーでインキュベートした担体上のペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化され、特異的な酵素反応を検出できることが示された。また、コントロール(チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファーでインキュベートした担体上のペプチドスポット及びペプチドを含まないスポット)では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 10

[0113] <ペプチドのニトロセルロース担体への固定化、ペプチド固定化担体の酵素反応による評価>

Nano-Plotter<sup>TM</sup> (GeSim社製)を用いて、実施例9で作製したペプチド溶液(5 pmol/ $\mu$ l)をスライド表面にニトロセルロースを有するFAST Slide (Schleicher & Schuell社製)上にスポットした。スポット径の大きさは直径0.4 mmであった。次いで、Uvstratalinker

2400(ストラタジーン社製, 中心波長254nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、120 mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は48秒であった。その後、前記担体を3%BSA溶液中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液(クエン酸二ナトリウム水溶液)も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

[0114] 上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinase (Upstate社製)を含むバッファー[2 U/50 μl 酵素, 25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100 μM ATP)を載せ、5時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FITC標識 anti-phosphotyrosine (シグマアルドリッチ社製)を含むバッファー(1 μg/100 μl 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1%BSA)を上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に載せ、2時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FLA 5000(富士写真フイルム社製)を用いて蛍光を測定した。

[0115] 一方、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファー[25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100 μM ATP]を載せ、5時間インキュベートし、前記FITC標識anti-phosphotyrosineを用いて2時間インキュベートしたペプチド固定化担体も作製した。

[0116] チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含むバッファーでインキュベートした担体上のペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化され、特異的な酵素反応を検出できることが示された。また、コントロール(チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファーでインキュベートした担体上のペプチドスポット及びペプチドを含まないスポット)では、蛍光を検出しなかった。

### 実施例 11

[0117] <ペプチドのアクリルアミドゲル担体への固定化、ペプチド固定化担体の酵素反応による評価>

スライド表面にアクリルアミドゲルを有するスライドをNallur等の方法[Nallur G, Luo C, Fang L, Cooley S, Dave V, Lambert J, Kukanskis K, Kingsmore S, Lasken R,

Schweitzer B. (2001) Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 29, e118.]に準じて作製した。Nano-Plotter™ (GeSim社製)を用いて、実施例9で作製したペプチド溶液 (5 pmol/μl) を前記スライド表面にアクリルアミドゲルを有するスライド上にスポットした。スポット径の大きさは直径 0.5 mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400 (ストラタジーン社製, 中心波長 254nm) を用い、紫外線を 16cm の距離から、120 mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。照射時間は 48 秒であった。その後、前記担体を 3% BSA 溶液中で 30 分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液 (クエン酸二ナトリウム水溶液) も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

[0118] 上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に、チロシン p60<sup>c-src</sup> kinase (Upstate 社製) を含むバッファー [2 U/50 μl 酵素, 25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100 μM ATP] を載せ、5 時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を 1×PBS-0.2% Tween 20 溶液で洗浄し、FITC 標識 anti-phosphotyrosine (シグマアルドリッチ社製) を含むバッファー (1 μg/100 μl 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA) を上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に載せ、2 時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を 1×PBS-0.2% Tween 20 溶液で洗浄し、FLA 5000 (富士写真フイルム社製) を用いて蛍光を測定した。

[0119] 一方、チロシン p60<sup>c-src</sup> kinase を含まないバッファー [25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100 μM ATP] を載せ、5 時間インキュベートし、前記 FITC 標識 anti-phosphotyrosine を用いて 2 時間インキュベートしたペプチド固定化担体も作製した。

[0120] チロシン p60<sup>c-src</sup> kinase を含むバッファーでインキュベートした担体上のペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化され、特異的な酵素反応を検出できることが示された。また、コントロール (チロシン p60<sup>c-src</sup> kinase を含まないバッファーでインキュベートした担体上のペプチドスポット及びペプチドを含まないスポット) では、蛍光を検出しなかった。

## 実施例 12

[0121] <ペプチドのポリリジン担体への固定化、ペプチド固定化担体の酵素反応による評価>

ペプチド合成機を用いて、配列番号8に示すアミノ酸配列を有するペプチド(6残基)を合成した。前記合成ペプチド及び配列番号9に示すオリゴヌクレオチド(20塩基)の5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドを等モルずつ0.1M 炭酸水素ナトリウムバッファー(pH 8.0)に溶解し、DMFに溶解した10倍モルのDSS(ピアス社製)を加えて、37℃にて2時間インキュベートした。次いで、逆相HPLC (Waters社製,  $\mu$  Bondasphere, C8 300A, 3.9x150)を用いて精製した後に濃縮し、45mMクエン酸二アンモニウム水溶液に溶解してペプチド溶液(10 pmol/ $\mu$ l)を調製した。

[0122] SP-BIO (Hitachi社製)を用いて、前記ペプチド溶液をスライド表面にポリリジンを有するスライド上にスポットした。スポット径の大きさは直径0.3 mmであった。次いで、Uvstratalinker 2400(ストラタジーン社製, 中心波長254nm)を用い、紫外線を16cmの距離から、240 mJ/cm<sup>2</sup>照射した。照射時間は96秒であった。その後、前記担体を1% BSA溶液中で30分間振とうし、洗浄した後に乾燥させた。一方、コントロールとしてペプチドを含まない溶液(クエン酸二ナトリウム水溶液)も同様に担体にスポットし、前述のような固定化の操作を行った。

[0123] 上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinase (Upstate社製)を含むバッファー[2 U/50  $\mu$ l 酵素, 25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100  $\mu$  M ATP]を載せ、5時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FITC標識 anti-phosphotyrosine (シグマアルドリッチ社製)を含むバッファー(1  $\mu$  g/100  $\mu$ l 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1%BSA)を上記ペプチド固定化担体の試料固定部分に載せ、2時間インキュベートした。次いで、上記ペプチド固定化担体を1×PBS-0.2% Tween 20溶液で洗浄し、FLA 5000 (富士写真フイルム社製)を用いて蛍光を測定した。

[0124] 一方、チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファー[25 mM Tris (pH 7.4), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 7 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 100  $\mu$  M ATP]を載せ、5時間インキュベートし、前記FITC標識anti-phosphotyrosineを用いて2時間インキュベートしたペプチド固

定化担体も作製した。

- [0125] チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含むバッファーでインキュベートした担体上のペプチドを含むスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化され、特異的な酵素反応を検出できることが示された。また、コントロール（チロシンp60<sup>c-src</sup> kinaseを含まないバッファーでインキュベートした担体上のペプチドスポット及びペプチドを含まないスポット）では、蛍光を検出しなかった。

### 実施例 13

- [0126] <ペプチドのポリカルボジイミド担体への固定化、SPOT法による伸長反応、ペプチド固定化担体の抗体反応による評価>

実施例1記載の方法に準じて、配列番号10に示すポリヌクレオチドが結合したペプチド(Ala-Ala:2残基)を作製し、カルボジイミド基を有する高分子化合物で処理したガラス基材上に前記ポリヌクレオチドが結合したペプチドを固定した。

- [0127] Tegge等の方法(Tegge W, Frank R: Determination of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinase Substrate Specificity by the Use of Peptide Libraries on Cellulose Paper. Biochemistry 1995, 34:10569-105777.)に準じて、前記ガラス基材上の試料固定部分でアミノ酸のカップリング(伸長)反応を繰り返し行い、配列番号11に示すペプチド(12残基)を前記ガラス基板上に合成した。このとき、N末端をFmoc基、側鎖をt-Bu基、trityl基あるいはBoc基で保護したアミノ酸を用い、さらに、カップリング試薬として、等モルのジイソプロピルカルボジイミド(和光純薬社製)及びヒドロキシベンゾトリアゾール(和光純薬社製)を用いて伸長反応を行った。また、各伸長反応において、DMF溶液に溶解したブロモフェノールブルー(0.1 mg/ml)を用いて、前記ガラス基材の試料固定部分を処理して試料固定部分が青色を呈色することを確認した後に、次の伸長反応を行った。

- [0128] 次いで、前記ガラス基材の試料固定部分を2%無水酢酸/DMF溶液で処理して合成したペプチドのN末端をアセチル化し、さらに、3%トリイソブチルシラン及び2%水を含むジクロロメタン/トリフルオロ酢酸(1:1)溶液を用いて、前記ガラス基材の試料固定部分を2時間室温にて処理してペプチド側鎖の脱保護反応を行った。

- [0129] また、コントロールとして、前記ポリヌクレオチドが結合したペプチドを前記ガラス基

板上に固定した後に、前記伸長反応を行わない試料も作製した。

[0130] 上記担体の試料固定部分に、Cy3標識抗アンジオテンシンI抗体を含む溶液(2.2  $\mu$ g/100  $\mu$ l 抗体, 1×PBS, 0.2% Tween 20, 1% BSA)を載せ、2時間インキュベートした。Cy3標識抗アンジオテンシンI抗体は、Cy3-NHS (GEヘルスケア社製)を用いて 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9) 中でCy3を抗アンジオテンシンI抗体(コスモバイオ社から購入)に導入したものを用いた。次いで、上記担体を滅菌水で洗浄し、ScanArray 4000 (GSI社製)を用いて蛍光を測定した。

[0131] 伸長反応を行ったスポットのみにシグナルが明瞭、かつ、特異的に検出されたことから、ペプチドが確実に固定化されていることが示された。また、コントロール(伸長反応を行っていないスポット)では、蛍光を検出しなかった。

#### 産業上の利用の可能性

[0132] タンパク質が強固に基材又は基材上の担体に結合できるため、本発明のタンパク質固定化基材は、再現性、定量性に優れたプロテインチップ等としての用途に有効なタンパク質固定化基材となり得る。

### 請求の範囲

- [1] 固定化生体分子(ただし、核酸を除く)を用いた該生体分子と相互作用し得る物質の検出法に用いられる固定化される生体分子であって、該生体分子が固定化される生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物が結合した生体分子。
- [2] 前記生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物が不飽和結合を有する化合物を含むポリマーである請求項1に記載の生体分子。
- [3] 前記ポリマーの平均重合度が2以上で1000000以下である請求項2に記載の生体分子。
- [4] 前記ポリマーを構成するモノマーがヌクレオチドである請求項2又は3に記載の生体分子。
- [5] 前記生体分子固定化用基材又は基材上の担体に結合し得る基を有する化合物がナイトレン前駆体、カルベン前駆体又はケトン基を有する化合物から選ばれる、少なくとも一つの光反応性基を有する化合物である請求項1に記載の生体分子。
- [6] 前記生体分子が、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド及び酵素から選ばれる請求項1〜5のいずれか1項に記載の生体分子。
- [7] 生体分子固定化用基材と、この基材上に固定化された請求項1〜6のいずれか1項に記載の生体分子とを有する生体分子固定化基材。
- [8] 生体分子固定化用基材と請求項1〜6のいずれか1項に記載の生体分子を接触させ、接触部に電磁波を照射することを含む生体分子固定化基材の製造法。
- [9] 固定化生体分子を用いた該固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法において、請求項7記載の生体分子固定化基材を用いることを特徴とする固定化生体分子と相互作用し得る物質の検出法。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/547

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/547, G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 3124037 B2 (Jacobsen, Mogens, Havsteen), 27 October, 2000 (27.10.00), Claims 9, 13, 29; page 12, right column, lines 22 to 28 & US 6033784 A & EP 820483 A & WO 96/31557 A	1-3, 5-9 4
X A	JP 10-512664 A (MULTILYTE LTD.), 02 December, 1998 (02.12.98), Page 13, line 25 to page 14, line 27 & US 2002/182617 A1 & EP 749581 A & WO 95/24649 A	1-4, 6, 7, 9 5, 8
P, X A	JP 2004-301515 A (Toa DKK Kabushiki Kaisha), 28 October, 2004 (28.10.04), Claims 1 to 7; Par. Nos. [0015] to [0017] (Family: none)	1, 5-9 2-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 March, 2005 (07.03.05)Date of mailing of the international search report  
22 March, 2005 (22.03.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001882

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2003-535317 A (PROLIGO LLC) , 25 November, 2003 (25.11.03) , Claims 1 to 10 & US 2003/215801 A1 & EP 1287404 A & WO 01/84234 A	1-3, 5-9 4
X A	JP 8-29428 A (Masashi FUNAYAMA) , 02 February, 1996 (02.02.96) , Claim 3 (Family: none)	1, 5-9 2-4

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/547

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/547、G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2005年

日本国登録実用新案公報 1994-2005年

日本国実用新案登録公報 1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 3124037 B2 (ヤコブセン, モーゲンス, ハブステーン) 2000.10.27 【請求項9】、【請求項13】、【請求項29】、 12頁右欄22行~28行	1-3、 5-9
A	& US 6033784 A & EP 820483 A & WO 96/31557 A	4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.03.2005

国際調査報告の発送日

22.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/547

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/547、G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2005年

日本国登録実用新案公報 1994-2005年

日本国実用新案登録公報 1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 3124037 B2 (ヤコブセン, モーゲンス, ハブステーン) 2000.10.27 【請求項9】、【請求項13】、【請求項29】、 12頁右欄22行~28行	1-3、 5-9
A	& US 6033784 A & EP 820483 A & WO 96/31557 A	4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.03.2005

国際調査報告の発送日

22.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-512664 A (マルティライト リミティド) 1998. 12. 02 13頁25行~14頁27行	1-4、 6、7、9
A	& US 2002/182617 A1 & EP 749581 A & WO 95/24649 A	5、8
PX	JP 2004-301515 A (東亜ディーケーケー株式会社) 2004. 10. 28 【請求項1~7】、【0015】~【0017】	1、5-9
A	(ファミリーなし)	2-4
X	JP 2003-535317 A (プロリゴ・エルエルシー) 2003. 11. 25 【請求項1~10】	1-3、 5-9
A	& US 2003/215801 A1 & EP 1287404 A & WO 01/84234 A	4
X	JP 8-29428 A (船山 政志) 1996. 02. 02 【請求項3】	1、5-9
A	(ファミリーなし)	2-4